AUS DER UNIVERSITÄTS-HAUTKLINIK UND POLIKLINIK
KLINIKUM STEGLITZ DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN
GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR:
PROF. DR. C.E. ORFANOS

# Einfluß synthetischer Retinoide auf die saure Lymphocytenphosphatase in vitro und unter therapeutischen Bedingungen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:
Hartmut Tiel
aus
Duisburg
1985

Druck: Copy-Center in Dahlem
Ladenbergstraße 2-4
1000 Berlin 33
Tel. 831 40 25

AUS DER UNIVERSITÄTS - HAUTKLINIK UND POLIKLINIK
KLINIKUM STEGLITZ DER FREIEN UNIVERSITÄT BERLIN
GESCHÄFTSFÜHRENDER DIREKTOR: PROF. DR. C.E. ORFANOS

# Einfluß synthetischer Retinoide auf die saure Lymphocytenphosphatase in vitro und unter therapeutischen Bedingungen

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:
Hartmut Tiel

aus
Duisburg

Referent: Prof. Dr. C.E. Orfanos

Korreferent: Prof. Dr. H. Kappus

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 18.4.1985

MEINEN ELTERN

GLIEDERUNG


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | Einleitung und Ziel der Arbeit | 1 |
| | ALLGEMEINER TEIL | 5 |
| II. | Grundzüge immunologischer Mechanismen | 5 |
| III. | Einfluß des Vitamin A und der Retinoide auf das Immunsystem | 8 |
| IV. | Mitogene Stimulierbarkeit peripherer humaner Lymphocyten | 12 |
| | EIGENE UNTERSUCHUNGEN | 13 |
| V. | Material und Methode | 13 |
| | Methoden | 15 |
| VI. | Ergebnisse | 20 |
| | 1. Aktivitätssteigerung der sauren Lymphocytenphosphatase unter Isotretinoin in vitro | 20 |
| | 2. Aktivitätssteigerung der sauren Lymphocytenphosphatase unter Etretinat in vitro | 20 |
| | 3. Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase unter der freien Säure Ro 10 - 1670 des aromatischen Retinoids in vitro | 21 |
| | 4. Ergebnisse unter therapeutischen Bedingungen in vivo | 21 |
| | Langzeitwirkung | 22 |
| VII. | Diskussion der Ergebnisse | 36 |
| VIII. | Zusammenfassung | 42 |
| IX. | Literatur | 44 |

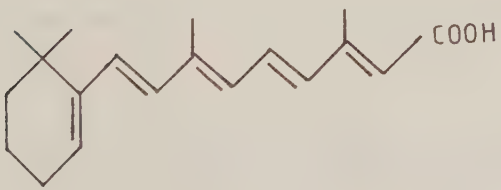
Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549619_0077

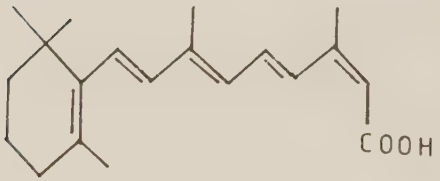
## I. Einleitung und Ziel der Arbeit

Vitamin A ist für den Organismus eine lebenswichtige Substanz. Ihre wichtigsten metabolitischen Produkte sind: Vitamin A - Ester, die in der Leber gespeichert werden, Vitamin A - Aldehyd (Retinal), welches in der 11 - cis Form für die visuelle Funktion entscheidende Bedeutung hat und Vitamin A - Säure. Darüber hinaus besitzt Vitamin A einen regulativen Effekt auf das Wachstum von epithelialem Gewebe; Vitamin A - Mangel führt zu Hyperkeratosen der Haut. Aus diesem Grunde versuchte man mannigfaltige Dermatosen, die mit Hyperkeratosen einhergehen, mit Vitamin A zu behandeln, jedoch waren der systematischen Anwendung von Vitamin A durch seine Toxizität Grenzen gesetzt. Deshalb mußten neue Substanzen mit besserem therapeutischen Effekt und weniger Nebenwirkungen gefunden werden. Durch Veränderungen am Molekül, am Ring, an den Seitenketten und an den polaren Gruppen wurden viele Abkömmlinge des Vitamin A, die Retinoide, synthetisiert, von denen einige wichtige Derivate folgende molekulare Struktur besitzen:

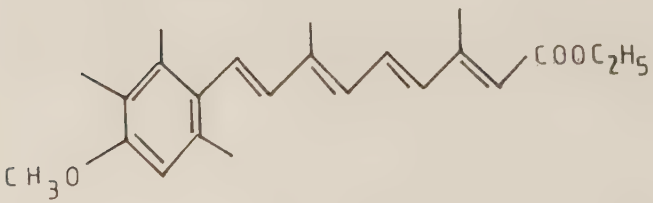
1) all - trans - Vitamin A - Säure
   ≙ all - trans - Retinoic acid
   ≙ Tretinoin (Retinsäure)



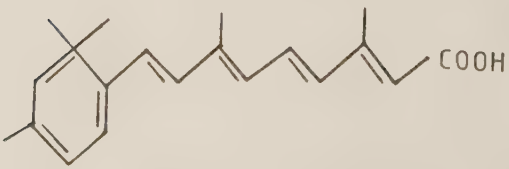
2) 13 - cis - Vitamin A - Säure
≙ 13 - cis Retinoic acid
≙ Isotretinoin (13 - cis - Retinsäure)
≙ Ro 4 - 3780



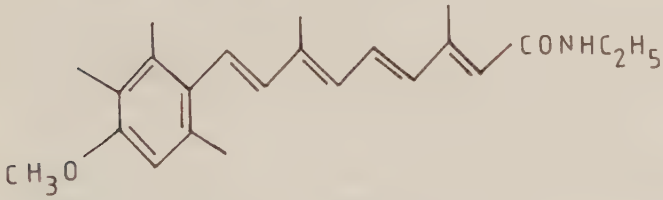

3) Trimethylmethoxyphenyl (TMMP)
analog of retinoic acid ethyl ester
≙ Etretinat
≙ Ro 10 - 9359



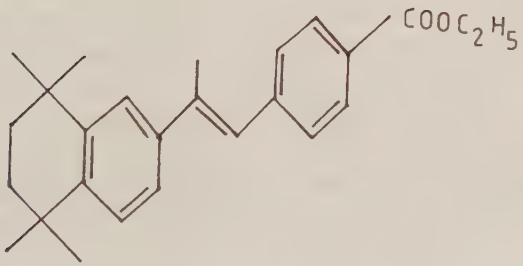

4) Freie Säure des aromatischen Retinoids Etretinat
≙ Ro 10 - 1670



5) Trimethylmethoxyphenyl (TMMP)
analog of retinoic acid ethyl amide
≙ Motretinid
≙ Ro 11 - 1430




6) Arotinoid ethyl ester
≙ Ro 13 - 6298




Orale Retinoide werden heute bei verschiedenen Hautkrankheiten eingesetzt, z.B.: bei schwerer Psoriasis vulgaris, ausgedehntem Lichen ruber planus, bei verschiedenen Formen von Ichthyosen, Pityriasis ruber pilaris, Morbus Darier, Erythrokeratodermia figurata variabilis und vielen anderen. Die Vitamin A - Abkömmlinge sind im Tierexperiment etwa 10 mal stärker wirksam als Vitamin A und sein Metabolit all - trans Vitamin A - Säure. Die pharmakologische Wirkung richtet sich vor allem auf die Epidermis im Sinne der Steuerung von Verhornungsvorgängen.

Darüber hinaus wurden auch Krankheiten außerhalb dieses Formenkreises mit Retinoiden behandelt. Das Isotretinoin eignet sich vor allem zur Behandlung der schweren Akne. Das Wissen um den Wirkungsmechanismus der synthetischen Retinoide ist eine sinnvolle Voraussetzung vor deren therapeutischer Anwendung. Insbesondere ist es in keiner Weise befriedigend erklärt, ob und inwiefern die Retinoide immunmodulierende Effekte haben.

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluß von drei wichtigen Vertretern der Gruppe (Isotretinoin, Etretinat und freie aromatische Säure) auf die cytoplasmatisch saure Lymphocytenphosphatase, einen wichtigen immunologischen Parameter, darzulegen und damit einen wichtigen Mosaikbaustein in der Beantwortung der genannten Frage zu liefern. Im ersten Ansatz werden wir uns mit dem Einfluß der Retinoide auf die Phosphataseaktivität in vitro beschäftigen, wobei in einem Versuchsteil die Lymphocyten noch zusätzlich mit Phytohämagglutinin (PHA), einem pflanzlichen Mitogen, stimuliert werden. Im einem zweiten Ansatz soll dann geklärt werden, ob sich die Ergebnisse, die aus den Versuchen in vitro gewonnen wurden, auf die Verhältnisse unter therapeutischen Bedingungen in vivo übertragen lassen.

ALLGEMEINER TEIL

## II. Grundzüge immunologischer Mechanismen

Bei Untersuchungen von Laboratoriumstieren, besonders Mäusen, hat man zahlreiche Befunde erhalten, die vermuten lassen, daß sich bei Säugetieren zwei Lymphocytenpopulationen (T - Lymphocyten und B - Lymphocyten) von den Zellen des Knochenmarks ableiten. Beide Populationen zirkulieren, durchwandern jedoch unterschiedliche Teile der lymphatischen Organe.

Nachdem ein Teil der Zellen (die späteren T - Lymphocyten) den Thymus verlassen haben, gelangen sie in die parakortikalen Bereiche der Lymphknoten und in die periarteriellen Scheiden der Milz - Lymphfollikel. Ausgehend von diesen Organen wandern die Zellen über den Blutstrom durch die efferenten Lymphbahnen, wonach sie wieder zu den lymphatischen Kompartimenten zurückkehren. Ein Merkmal der T - Lymphocyten ist ihre Fähigkeit, auf Kontakt mit dem Antigen "Blasten" zu bilden, aus welchen kleine sensibilisierte Lymphocyten entstehen, die für die verzögerte Überempfindlichkeitsreaktion verantwortlich sind. T - Lymphocyten bilden keine Antikörper, die in das Serum sezerniert werden, doch besitzen sie sehr wahrscheinlich Antigen erkennende Rezeptoren an ihren Oberflächen. In der Thymusrinde transformieren sich die Stammzellen zunächst durch eine Reihe von Teilungen in große Blasten; die Zellen werden kleiner und nähern sich der Morphologie von Lymphocyten: Thymocyten. Diese besitzen an ihrer Zellmembran mindestens sieben Alloantigene, die Thy - 1, Tla, Gv - 1, Ly - 1, Ly - 2, Ly - 3 und Ly - 5 genannt werden. Während der Reifung verlieren die T - Lymphocyten das Tla - Antigen, weisen vermindert Thy - 1 Antigen auf, und gleichzeitig vermehren sich die

Histokompatibilitätsantigene. Eine größere Zahl von T - Lymphocyten wird im Ductus thoracicus und im Blut gefunden; Lymphknoten enthalten mehr als Milz und relativ selten sind sie im Knochenmark.

Ein anderer Teil der Zellen, die späteren B - Lymphocyten, wandern in thymusunabhängige Bereiche (Bereiche, die durch eine Thymektomie nicht betroffen werden): die Follikel und das Mark der Lymphknoten, die peripheren Bereiche der weißen Pulpa der Milz und die Follikel des lymphatischen Gewebes im Darm. Jede B - Zelle trägt auf ihrer Membran ungefähr 100000 Antikörper - Moleküle mit der gleichen Spezifität. Man hat berechnet, daß jeder Organismus ca. $10^5$ verschiedene Typen von B - Lymphocyten im lymphatischen Gewebe besitzt und daß ein spezielles Antigen von ca. 10 Millionen B - Lymphocyten gebunden werden kann. Aktivierte B - Lymphocyten vergrößern und teilen sich. Die Blasten teilen sich wiederholt und differenzieren sich während jeder Teilung, wobei sie jedesmal eine größere Zahl kleinerer Zellen erzeugen, die der Antikörpersynthese besser angepaßt sind. Die endgültige Plasmazelle ähnelt weder einem Blasten noch einem Lymphocyten.

Die spezifische B - Zellaktivierung erfordert mindestens zwei Signale: die Bindung der Antigendeterminanten an membrangebundene Immunglobulinrezeptoren und ein anderes - noch nicht definiertes Signal - von den T - Helferzellen.

Die Immunoglobinmoleküle sind anscheinend zufällig über die Oberfläche verteilt. Es scheint, daß das $F_{a,b}$ - Fragment nach außen exponiert ist, daß die B - Zellen über ihre Antikörper Antigene binden können; auch ein Teil des $F_c$ - Fragments muß nach außen exponiert sein, da Antikörper, die spezifisch für die schweren Ketten sind,

mit B - Zell - Immunglobulinen reagieren.

T - und B - Lymphocyten unterscheiden sich in ihrer Reaktivität gegenüber Lectinen. Lectine sind pflanzlichen oder bakteriellen Ursprungs und können in vitro eine Lymphocytenaktivierung induzieren. B - Zellen sind relativ unempfindlich gegenüber Lectinen wie Phytohämagglutinin oder Concanavalin A, die sehr wirkungsvoll T - Lymphocyten aktivieren. Neuere experimentelle Befunde deuten darauf hin, daß die T - Zellen einen regulativen Effekt auf B - Zellen haben können, und zwar einen positiven und einen negativen. Es bestehen somit zwei Klassen von T - Zellen, eine, die eine Immunantwort unterstützt, die T - Helferzellen, und eine andere, die die Immunreaktivität unterdrückt, die T - Suppressorzellen. T - Lymphocyten sind auch Killerzellen, die sich durch ein anderes Ly - Antigen von den Suppressorzellen unterscheiden.

## III. Einfluß des Vitamin A und der Retinoide auf das Immunsystem

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von immunologischen Wirkungen der Retinoide nachgewiesen. Rhodes und Oliver (22) untersuchten den Einfluß von Retinoiden in nicht toxischen Konzentrationen auf Makrophagen und zeigten, daß Vitamin A und die all - trans - Vitamin A - Säure die Fähigkeit der Makrophagen zur Phagozytose herabsetzte. Demgegenüber fanden Dennert et al (10) in vivo und in vitro Versuchen, daß die all - trans - Vitamin A - Säure ein potentieller Stimulator für die cytotoxische Aktivität der Makrophagen und der Monocyten ist. Die zellgebundene Immunität von Mäusen gegen Schaferythrozyten wird durch eine Dosis von 150 µg Isotretinoin, Etretinat und Motretinid in einem Zeitraum von drei Tagen bis zu drei Wochen signifikant erhöht (Athanassiades (3)). Mäuse, die mit einer hohen Dosis Vitamin A behandelt wurden, zeigten eine deutlich schnellere und erhöhte Immunabwehr gegen Listeria monocytogeneses und Schaferythrocyten als die Kontrollgruppe, die kein Vitamin A bekommen hatte. Hof und Wirsing (19) schlossen daraus, daß hohe Dosen von Vitamin A das Immunsystem stimulieren können. Den gleichen Versuch machten Hof und Emmerling (18): sie tauschten Vitamin A gegen Etretinat aus und applizierten dieses Retinoid an Mäusen. Hier zeigte sich, allerdings nur, wenn hohe Dosen Retinoid gegeben wurden, eine höhere und schnellere Immunität gegenüber Listeria monocytogenes und Schaferythrocyten. Offenbar kann die zellgebundene Immunität durch Retinoide potenziert werden. Barnett (5) zeigte, daß Mäuselymphocyten mit einem hohen IgE - Spiegel reagierten, nachdem man ihnen vorher eine Dosis Eieralbumin injiziert hatte, wenn man die Tiere mit Isotretinoin vorbehandelte.

Fulton et al (12) untersuchten die Hautreaktion auf verschiedene Antigene bei Psoriatikern nach Vorbehandlung

mit Etretinat. Die Patienten zeigten nach Antigenapplikation eine stärkere Reaktion als die Kontrollgruppen, die entweder klinisch gesund waren oder kein Retinoid erhalten hatten. Sidell et al (24) untersuchten den Einfluß von Retinoiden auf humane T - Lymphocyten. Nach Inkubation von T - Lymphocytenkulturen mit all - trans - Vitamin A - Säure und Mitogenen wurde die Blastogenese der Lymphocyten umd das 2,5 - fache erhöht. Allerdings ist diese blastogene Stimulation der Lymphocyten durch Retinoide abhängig von der Herkunft der Lymphocyten: während T - Lymphocytenkulturen aus den Tonsillen die oben beschriebenen Effekte zeigten, galt dieses nicht für Milz- oder Blutlymphocyten. Nach Ansicht der Autoren kann die all - trans - Vitamin A - Säure möglicherweise die Differenzierung von T - Zellen fördern.

Micksche et al (21) konnten zeigen, daß hochdosierte Vitamin A Therapie bei Patienten mit malignen Neubildungen, deren Immunsystem dadurch supprimiert war, die blastogene Lymphocytenantwort auf Mitogene steigern konnte. Die Autoren konnten allerdings nicht erklären, ob dieser Effekt auf eine Retinoid - induzierte Differenzierung oder durch eine Restaurierung zustande kam. Bialasiewicz et al (9) postulierten, daß Etretinat das Gleichgewicht zwischen T - Helfer- und T - Suppressorzellen stören und so einen Einfluß auf das Immunsystem ausüben können. Tsambaos und Orfanos (30) konnten zeigen, daß Etretinat bei behandelten Psoriatikern Monocyten und Lymphocyten stimulieren und ihre Differenzierung in Sézary - ähnliche Lymphocyten, aktivierte Makrophagen und dermale Langerhanszellen fördern kann.

Soppi et al (27) stellten fest, daß nicht toxische Konzentrationen von all - trans - Vitamin A - Säure die PHA - Antwort von Lymphocyten signifikant erhöht. Bei der Verwendung von Etretinat konnte dieser Effekt nicht

beobachtet werden; jedoch stimulierte Etretinat die Suppressorzellaktivität, welche wiederum unter all - trans - Vitamin A - Säure unbeeinflußt blieb. Weder Etretinat noch all - trans - Vitamin A - Säure zeigten die oben beschriebenen Wirkungen auf die Lymphocyten, wenn man anstelle von PHA das pflanzliche Mitogen ConA verwendete. Nach Abb und Deinhardt (2) können nicht toxische Konzentrationen von all - trans - Vitamin A - Säure die DNA - Synthese von peripheren Lymphocyten unter PHA - Stimulation erhöhen, während es gleichzeitig zu einer Suppression der Interferonproduktion in diesen stimulierten Lymphocytenkulturen kommt. Außerdem wird die spontane Aktivität von humanen Killerzellen eingeschränkt (Abb und Deinhardt (1)). Nach Hercend et al (14) kann Etretinat die alterssupprimierte Antitumoraktivität von peritonealen Makrophagen und die cytotoxische T - Zellaktivität steigern. Bauer und Orfanos (7) untersuchten den Einfluß des Retinoids Ro 10 - 1670, den Hauptmetaboliten des Etretinats, auf periphere humane Lymphocyten in Gegenwart von pflanzlichen Mitogenen (ConA, PHA - M, PHA - P und PWM). Dabei unterdrückte Ro 10 - 1670 die durch Mitogen induzierte DNA - Neusynthese bei peripheren humanen Lymphocyten in vitro, wobei Ro 10 - 1670 ohne zusätzliche Mitogendosis keinen Effekt zeigte. Nach den Autoren besteht ein möglicher Wirkungsmechanismus für die Interaktion von Retinoid, Lymphocyten und Mitogen darin, daß das Retinoidmolekül sich an der Zellmembran der Lymphocyten anlagert und somit einen zellulären Angriff für das Mitogen unmöglich macht. Eine andere Erklärung wäre nach den Autoren, daß sich das Retinoid an den hydrophoben Teil des Mitogenmoleküls anlagert, wodurch dann ebenfalls eine mitogene Stimulation der Lymphocyten ausbleibt. Bauer und Orfanos (6) konnten zeigen, daß sich nach Bindung des Retinoids an das Mitogen das UV - Spektrum ändert. Mastro und Pepin (20) kamen in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, daß die all -

trans - Vitamin A - Säure selbst einen Effekt auf die DNA - Synthese von Rinderlymphocyten hat, indem sie nämlich die DNA - Synthese unterdrückt. Aber auch die durch Mitogene induzierte Neusynthese der DNA konnte bei Rinderlymphocyten durch all - trans - Vitamin A - Säure supprimiert werden. Die Stärke des suppressiven Effekts hängt nach den Autoren von der Konzentration des Mitogens bzw. Retinoids ab. Soppi et al (26) fanden bei Patienten mit M. Darier, die mit Etretinat behandelt wurden, eine unterdrückte Lymphocytenantwort nach PHA - Stimulierung. Nach den Autoren kann dieser Effekt auf einer Erhöhung der Suppressor - Zellaktivität beruhen. Auch Skinnider und Giesbrecht (25) fanden heraus, daß Vitamin A die Stimulation von humanen Lymphocyten durch PHA hemmt. Rogers et al (23) fanden bei mit Vitamin A behandelten Mäusen eine erhöhte Durchlässigkeit der lysosomalen Membranen in den Lymphocyten. Nach Wang et al (33) kann es dabei im Extremfall zu einer Destabilisierung der Lysosomenmembran kommen. Bauer und Orfanos (8) kamen in ihren Versuchen mit dem oralen Retinoid Ro 10 - 9359 an polymorphkernigen Leucocyten bei mit Tigason behandelten Psoriatikern im Vergleich zu Kontrollgruppen klinisch gesunder Probanden und noch nicht Retinoid - behandelter Patienten mit Psoriasis vulgaris zu dem Ergebnis, daß das orale Retinoid Ro 10 - 9359 (Etretinat, Tigason®) mit dem mikrotubulären Zellsystem interferieren kann und die gerichteten Eigenbewegungen der polymorphkernigen Leucocyten in vitro hemmt. Wahrscheinlich spielen alle diese Gründe eine Rolle dafür, warum es unter all - trans - Vitamin A - Säure zu einem Anstieg der cytoplasmatischen sauren Phosphatase - Aktivität kommt (Takenaga et al (29)).

## IV. Mitogene Stimulierbarkeit peripherer humaner Lymphocyten

Durch Mitogene wie Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (ConA) und Pokeweed Mitogen (PWM) kommt es zu einer Aktivierung eines großen Teils von Lymphocyten gesunder Probanden mit biochemischen und physiologischen Veränderungen nach einem Zeitraum von nur einer Stunde. Des weiteren kommt es zu Elektrolytveränderungen wie $K^+$ - und $Ca^{++}$ - Influx und $Na^+$ - Efflux. Daraus folgt, daß sich unter Mitogeneinfluß das Transportverhalten der Zellmembran ändert (Spölgen (28)). T - und B - Lymphocyten antworten selektiv auf unterschiedliche Mitogene (Greaves und Janossy (13)), wobei die Zellspezifität in Abhängigkeit von der Darreichungsform der Mitogene steht (Diener und Langmann (11)). Schon nach einstündiger Inkubation kommt es zu einer deutlichen Steigerung der sauren Phosphatase, die in den lysosomenartigen Granula im Cytoplasma der Lymphocyten lokalisiert ist (Hirschborn et al (16)). Der Wirkungsmechanismus beruht auf einer Vermittlung von 3' - 5' Cycloadenosinmonophosphat (Diener und Langmann (11)). 5 bis 10 Minuten nach PHA - Zusatz steigt der Spiegel des cAMP, wobei Inhibition der cAMP - Synthese die mitogene Stimulierung blockiert. Nach Uhlenbruck (31) existiert wahrscheinlich auf der Lymphocytenoberfläche ein PHA - Rezeptor. Eine kontrollierte Freisetzung der Enzyme aus den lysosomenartigen Granula, d.h. hauptsächlich der sauren Phosphatase soll zur Depression der Lymphocyten führen, denn bei starker lysosomaler Aktivierung kann es, durch eine Selbstschädigung der Zelle, zu vermehrten Zahlen morbider und prämorbider Zellen kommen, die absterben und so nicht mehr in die Mitose eintreten (Allison und Malluci (4), Hirschborn et al (17) Yam und Mitus (34)). Zwischen Zellteilung und Aktivität der cytoplasmatischen sauren Phosphatase besteht nach Voßmann (32) eine direkt negative Beziehung.

## EIGENE UNTERSUCHUNGEN

### V. Material und Methode

Für die technische Durchführung der vorliegenden Studie wurden folgende Lösungen verwendet:

- Dextranlösung mit folgender Zusammensetzung:
  50 g Dextran (Dextran - T 250, MG 250 000)
  9 g NaCl
  auf 1000 ml Aqua dest. Dieses entspricht einer 5 % - igen Dextranlösung in isotoner Kochsalzlösung.

- Kulturmedium:
  90 ml RPMI - Medium
  10 ml Kalbsserum
  100 IU Penicillin - G - Natrium
  1 ml Glutamin
  Die Lösung diente zur Lagerung und zum Waschen der Lymphocyten.

- 0,015 molare Lösung von p - Nitrophenylphosphat:
  282 mg p - Nitrophenylphosphat (NPP) - Dinatrium - Hexahydrat (Fa. C. Roth, Karlsruhe, Art. Nr.: 4165, MG 371,16) wurden in 50 ml Aqua dest. gelöst und auf pH 5,6 eingestellt.

- Michaelispuffer - Stammlösung:
  19,43 g Na - Acetat, Krist. (Fa. Merck, Darmstadt, Art. Nr.: 626, MG 136,8)
  29,43 g Na - Barbital, Krist. (5,5 - Diäthylbarbitalsäure-Na, Fa. Merck, Darmstadt, Art. Nr.: 6318, MG 206,18)
  Beides wurde auf 1000 ml Aqua dest. aufgefüllt, pH - Wert 5,6, Molarität 0,14

- Michaelispuffer - Gebrauchslösung:
  50 ml Stammlösung
  20 ml 8,5 % - ige NaCl - Lösung
  70 ml Aqua dest.
  70 ml 0,1 n HCl - Lösung
  Die HCl - Lösung wurde unter ständigem Rühren hinzugegeben.
  Die Pufferlösung wurde auf pH 5,6 eingestellt und danach mit Aqua dest. auf 250 ml aufgefüllt.
  Molarität 0,166, gelagert bei 4° C, verwendbar: 21 Tage

- Glycocollpuffer nach Sørensen:
  3,75 g Glycocoll (Glycerin, MG 75,1)
  2,92 g NaCl
  Beides wurde auf 500 ml Aqua dest. verdünnt. Danach wurde die Lösung mit 0,1 n NaOH auf pH 12 eingestellt. Somit handelt es sich um eine 0,1 molare Glycocolllösung in 0,1 n NaOH.

- PHA - P - Lösung:
  PHA - P (Baco - Phytohämagglutinin - P gelagert bei 4° C, Difco - laboratories, Detroit, Michigan, USA) wurde in RPMI - Medium gelöst. Zuerst wurde eine hochkonzentrierte Lösung hergestellt und danach die erforderliche PHA - P Menge mit Hilfe einer automatischen Pipette zu den jeweiligen Kulturansätzen hinzugegeben.

- weitere Hilfsmittel:
  NaCl, krist. MG 58,44, NaOH - Titrisol®, 1 n Natronlauge, HCl - Titrisol®, 1 n Salzsäure, verschiedene automatische Pipetten mit auswechselbaren Spitzen, Reagenzgläser verschiedener Größe mit Stopfen, eine automatische Zentrifuge, pH - Meter, Magnetrührer, elektronisches Zählgerät für weiße Blutkörperchen, Eppendorf - Photometer, Thomas - Zählkammer, elektronische Feinwaage, Wasserbad.

Methoden

Für die in vitro - Versuche wurden für jedes der geprüften Retinoide (Isotretinoin Ro 4 - 3780, Etretinat Ro 10 - 9359 und der freien Säure des aromatischen Retinoids Ro 10 - 1670) von 27 klinisch gesunden Probanden, 12 Frauen und 15 Männer im Alter von 25 bis 59 Jahren, 27 ml venöses Vollblut entnommen und mit 3 ml Heparin (Liquemin® 5000) versetzt, um die Gerinnung zu hemmen. Anschließend wurden ohne Zeitverzug sofort die Lymphocyten isoliert. Dazu wurde die 30 ml Blut - Heparin - Lösung mit der gleichen Menge NaCl verdünnt. Je 18 ml diese Lösung wurde mit 6 ml Ficoll - Lösung (Ficoll - Metrizoat, Dichte 1,077 bei 4° C, Nr.: 6113, Fa. Seromed) ohne Vermischung in sterilen Glasröhrchen überschichtet und anschließend über eine halbe Stunde bei 300 - 400 g (≙ 1200 U / min) zentrifugiert. Die Lymphocyten reichern sich in der Grenzschicht an, einer weißen Bande auf dem oberen Teil der Ficoll - Lösung. Sie wurden mit Pasteurpipetten entnommen, zweimal mit dem einfachen RPMI - Medium und einmal mit dem kompletten RPMI - Nährmedium gewaschen. Anschließend wurde die Zellzahl mikroskopisch mit der Thomas-Zählkammer und elektronisch mit einem "white blood cell counter" auf die erforderliche Zahl von $2 \times 10^5$ Zellen / ml Nährmedium eingestellt. In jedes Röhrchen mit $2 \times 10^5$ Zellen wurde nun das jeweilige Retinoid in folgenden Konzentrationen hinzugegeben:

| | | |
|---|---|---|
| 0,1 | µg Retinoid - Zusatz | / ml Zellsuspensionslösung |
| 1 | " | " |
| 2 | " | " |
| 5 | " | " |
| 10 | " | " |
| 50 | " | " |
| 100 | " | " |
| 200 | " | " |

Anschließend wurde in jedes Röhrchen 50 µg PHA - P hineingegeben. Die Proben kamen anschließend in ein Wasserbad bei 37° C für eine Stunde, wurden danach bei 225 g über 10 Minuten zentrifugiert und anschließend mit 5 ml physiologischer NaCl gewaschen. Entsprechend der Methode nach Gillissen et al (12a + 12b) wurden zur Bestimmung der Aktivität der sauren Phosphatase folgende Lösungen zum Sediment gegeben:

2,0 ml frisches Aqua dest. (pH 5,6)
2,5 ml Michaelispuffer (pH 5,6)
1,5 ml p - Nitrophenylphosphatlösung (pH 5,6)

jeweils in jedes Röhrchen. Erneut wurde über eine halbe Stunde bei 37° C im Wasserbad inkubiert und danach die enzymatische Reaktion durch Hinzufügen von

4 ml NaOH - Lösung (pH 12) und
0,5 ml Glycocollpuffer (pH 12)

gestoppt. Abschließend wurde diese Lösung hochtourig (1000 g) zentrifugiert. Die Extinktion wurde photometrisch (Eppendorf - Photometer ) bei einer Wellenlänge von 405 nm in 10 mm Küvetten gegen Aqua dest. gemessen. Die Aktivitätszunahme der cytoplasmatischen sauren Phosphatase ist Ausdruck einer Stoffwechseländerung in den lymphocytären Zellen. Als Maß in der Veränderung der Aktivität der sauren Phosphatase dient die Differenz in der Extinktion zwischen PHA - stimulierten und nicht stimulierten Testansätzen resp. den Testansätzen mit und ohne Retinoid. Die Werte sind dann mit Hilfe einer Eichkurve als freigesetzte Menge p - Nitrophenol (NP) interpretierbar. Bei der Messung der Enzymaktivität handelt es sich vom chemischen Gesichtspunkt her um eine Zweipunktmethode: p - Nitrophenolphosphat (NPP) wird in Phosphat und p - Nitrophenol gespalten. Die nach einer gewissen Zeit freiwerdende p - Nitrophenol - Menge ist proportional der Phos-

phataseaktivität. Sowohl Ausgangs- wie Endprodukt sind im sauren pH - Bereich ungefärbt. Durch Alkalizusatz wird einerseits die Reaktion durch Enzymdenaturierung gestoppt, andererseits das p - Nitrophenol in das gelbe Nitrophenolat - Ion (Delokalisation der Elektronen über das gesamte Molekül) überführt und damit photometrisch faßbar mit einer Farbentwicklung bei pH 12. Somit ergeben sich folgende Testansätze:

K = Leerwert: 2 x $10^5$ Zellen + Nährmedium

K' = 2 x $10^5$ Zellen + Nährmedium + 50 µg PHA - P

1' = 2 x $10^5$ Zellen + Nährmedium + 50 µg PHA - P + 1 µg des jeweiligen Retinoids (analoges gilt für 0,1; 1; 2; 5; 10; 50; 100; 200 µg)

1 = 2 x $10^5$ Zellen + Nährmedium + 1 µg des jeweiligen Retinoids (analoges gilt für 0,1; 1; 2; 5; 10; 50; 100; 200 µg)

PSK = Puffersubstratkontrolle = alle verwendeten Reagentien mit Ausnahme der Lymphocyten. Sie dienen zur Ausschaltung fehlerhafter Einflußnahmen seitens der Substrate und Reagentien. Ihre Extinktionswerte werden von denen der anderen Ansätze abgezogen.

Die Steigerung der Phosphataseaktivität läßt sich dann folgendermaßen bestimmen: Aktivität der sauren Lymphocytenphosphatase bei 2 x $10^5$ Zellen unter einer bestimmten Retinoidkonzentration (0,1; 1; 2; 5; 10; 50; 100; 200 µg Retinoid) mit resp. ohne PHA - P abzüglich der Basisaktivität K (≙ Aktivität der sauren Phosphatase bei 2 x $10^5$ Zellen ohne Retinoid und ohne PHA - P). Somit bedeutet in den Tabellen und Abbildungen:

Δ 0,1: Aktivitätssteigerung der sauren Lymphocytenphosphatase bei 2 x $10^5$ Zellen mit 0,1 µg des jeweiligen Retinoids (analoges gilt für die übrigen Konzentrationen).

Δ 0,1': Aktivitätssteigerung der sauren Lymphocytenphosphatase in µg NP (siehe Material und Methode) bei 2 x $10^5$ Zellen mit 0,1 µg des jeweiligen Retinoids + 50 µg PHA - P (analoges gilt für die anderen Konzentrationen.

Δ K': Aktivitätssteigerung der sauren Lymphocytenphosphatase bei 2 x $10^5$ Zellen ohne Retinoid, aber mit 50 µg PHA - P.

Bei den Untersuchungen unter therapeutischen Bedingungen wurde die Steigerung der Phosphataseaktivität (Aktivität der sauren Phosphatase mit 50 µg PHA - P abzüglich der Basisaktivität K ohne PHA - P) bei folgenden Prüfkollektiven bestimmt:

1) Kontrollkollektiv bestehend aus 90 klinisch gesunden Probanden; 53 Frauen und 37 Männer (Mitarbeiter des Klinkums Steglitz; Studenten; traumatologische Patienten, die kurz vor der Entlassung standen) im Alter zwischen 25 - 61 Jahren. Die Blutentnahme erfolgte morgens, anschließend wurden ohne Zeitverzug die Lymphocyten isoliert und die Aktivität der sauren Phosphatase bestimmt.

2) Kontrollkollektiv bestehend aus 7 Patienten mit Psoriasis vulgaris; 4 Frauen und 3 Männer im Alter zwischen 38 - 63 Jahren, die sich in der Zeit von April 1983 bis August 1983 zur Behandlung im Klinikum Steglitz befanden. Die Therapie dieses Kontrollkollektivs bestand aus Cignolin - Vaseline (Dithranol - Vaseline),

Photochemotherapie mit externer Meladinine Lösung 0,15 % und anschließender UV - A - Bestrahlung sowie aus systemischer Photochemotherapie (PUVA), ohne orale oder lokale Retinoidanwendung.

3) Prüfkollektiv bestehend aus 21 Patienten mit Psoriasis geographica (4 Patienten), pustulosa palmaris et plantaris (3 Patienten), erythrodermia (4 Patienten) und pustulosa (3 Patienten). Ein Teilkollektiv bestand aus 10 Frauen und 7 Männern in einem Alter von 41 - 71 Jahren. Die Therapiedauer betrug 10 - 37 Tage mit einer Dosis von 25 bis 40 mg Etretinat pro Tag. Eine weitere Gruppe von 4 Patienten (3 Männer, 1 Frau) zwischen 39 - 53 Jahren standen bereits seit über 1 Jahr unter oraler Retinoid - Therapie (ca. 40 mg Etretinat / Tag) und wurden gesondert ausgewertet.

4) Prüfkollektiv bestehend aus drei Patienten mit M. Darier (schwere vegetierende Form) zwischen 27 - 59 Jahren. Die Hautveränderungen waren bei zwei Patientinnen am Halsausschnitt, bei einer dritten Patientin zusätzlich an den Beinen lokalisiert. Die Therapiedauer betrug 12 - 20 Tage mit einer Dosis von 35 bis 50 mg Etretinat / Tag.

5) Prüfkollektiv bestehend aus 12 Männer mit Akne conglobata in einem Alter von 18 - 29 Jahren. Davon wurden 9 Patienten 17 - 110 Tage mit durchschnittlich 55 mg Isotretinoin / Tag ambulant behandelt. Weitere 3 Männer, 27 - 35 Jahre alt, standen bereits seit 1 Jahr unter Retinoidbehandlung und wurden zur Erfassung eines möglichen Langzeiteffekts gesondert ausgewertet.

## VI. Ergebnisse

### 1. Aktivitätssteigerung der sauren Lymphocytenphosphatase unter Isotretinoin in vitro

Lymphocyten zeigen unter Isotretinoin mit und ohne PHA - P eine veränderte Aktivität der sauren Lymphocytenphosphatase. Ohne PHA - P kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivitätssteigerung der cytoplasmatischen sauren Phosphatase bei einer Konzentration von 5 µg Isotretinoin ($p \leq 0,01$) und 50 µg Isotretinoin ($p \leq 0,01$). Stimulierte man die Lymphocyten zusätzlich mit einer Dosis von 50 µg PHA - P, so zeigte sich ebenfalls eine signifikant höhere Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase bei einer Konzentration von 5 µg Isotretinoin ($p \leq 0,01$) und 50 µg Isotretinoin ($p \leq 0,01$) als bei anderen Konzentrationen.

### 2. Aktivitätssteigerung der sauren Lymphocytenphosphatase unter Etretinat in vitro

Unter Etretinat war die Aktivitätssteigerung der cytoplasmatischen sauren Phosphatase bei einer Retinoidkonzentration von 10 µg Etretinat signifikant höher ($p \leq 0,01$) als bei anderen Retinoidkonzentrationen. Auch nach zusätzlicher mitogener Stimulation der Lymphocyten durch 50 µg PHA - P fiel die Aktivitätssteigerung der sauren Lymphocytenphosphatase unter einer Retinoidkonzentration von 10 µg Etretinat signifikant ($p \leq 0,01$) höher aus als unter anderen Retinoidkonzentrationen.

### 3. Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase unter der freien Säure Ro 10 - 1670 des aromatischen Retinoids in vitro

Unter der freien Säure Ro 10 - 1670 des aromatischen Retinoids zeigte die cytoplasmatische saure Lymphocytenphosphatase bei zwei Retinoidkonzentrationen eine signifikant erhöhte Aktivitätssteigerung, und zwar bei einer Konzentration von 5 µg Retinoid ($p \leq 0,01$) und bei 50 µg Retinoid ($p \leq 0,01$). Den gleichen Effekt zeigten die Lymphocyten, wenn man sie zusätzlich noch mit einer Dosis von 50 µg PHA - P stimulierte. Auch hier fiel die Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase bei 5 µg Retinoid ($p \leq 0,01$) und bei 50 µg Retinoid ($p \leq 0,0\mu$) signifikant höher aus als bei höheren oder niedrigeren Konzentrationen an freier aromatischer Säure.

### 4. Ergebnisse unter therapeutischen Bedingungen in vivo

Die Aktivitätssteigerung der sauren Lymphocytenphosphatase bei den 90 klinisch gesunden Probanden betrug nach einer Dosis von 50 µg PHA - P 1,5 µg NP. Bei dem Patientenkollektiv mit Psoriasis vulgaris, die nicht mit oralen Retinoiden behandelt worden waren, ergab sich eine Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase nach 50 µg PHA - P von 1,6 µg NP. Dabei fanden sich im Vergleich zum Normalkollektiv keine oder nur sehr geringe Unterschiede. Bei den Patienten allerdings, die mit Etretinat (Tigason®) behandelt worden waren, zeigte sich eine signifikant höhere Aktivitätssteigerung der cytoplasmatischen sauren Phosphatase ($p \leq 0,01$) mit einem arithmetischen Mittelwert von 6,8 µg NP als bei den klinisch gesunden Probanden bzw. dem Patientenkollektiv mit Psoriasis vulgaris, die nicht mit Tigason® behandelt worden waren. Auch bei den mit Tigason® behandelten Patienten mit Morbus Darier war die Aktivitätssteigerung der sauren Lymphocytenphos-

phatase mit 10 µg NP nach einer Inkubation der Lymphocyten mit 50 µg PHA - P deutlich höher als bei den klinisch gesunden Kontrollprobanden. Ein prinzipiell ähnliches Ergebnis zeigte sich bei den Patienten mit Akne conglobata, die mit 55 mg Isotretinoin pro Tag 17 bis 110 Tage behandelt worden waren. Die Steigerung der Phosphataseaktivität nach 50 µg PHA - P fiel bei diesem Patientenkollektiv signifikant ($p \leq 0{,}01$) höher aus als bei der klinisch gesunden Kontrollgruppe.

### Langzeitwirkung

Ein anderes Ergebnis zeigte sich, wenn man die Steigerung der Phosphataseaktivität bei Patienten untersuchte, die schon länger als ein Jahr mit Etretinat resp. unter Isotretinoin behandelt worden waren. Bei diesen Patienten war die Steigerung der Phosphataseaktivität nach Inkubation de Lymphocyten mit 50 µg PHA - P mit einem arithmetischen Mittelwert von 1,1 µg NP resp. 1,6 µg NP annähernd gleich der Aktivitätssteigerung beim Normalkollektiv.

Tabelle 1 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter Isotretinoin ohne PHA - P

| µg Isotretinoin | 0 | Δ 200 | Δ 100 | Δ 50 | Δ 10 | Δ 5 | Δ 2 | Δ 1 | Δ 0,1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Anzahl der Versuche " n " | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| Arithm. Mittelwert " $\bar{x}$ " in µg NP | 0 | 0,25 | 0,46 | 0,89 | 0,74 | 1,39 | 0,88 | 0,75 | 0,37 |
| Standardabweichung | 0 | 0,19 | 0,30 | 0,32 | 0,41 | 0,42 | 0,31 | 0,32 | 0,12 |
| min. - max. in µg NP | 0 | 0,1-0,5 | 0,2-0,7 | 0,5-1,3 | 0,3-1,2 | 1,0-2,0 | 0,5-1,2 | 0,4-1,2 | 0,1-0,7 |

Tabelle 2 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter Isotretinoin mit 50 µg PHA - P

| µg Isotretinoin | Δ K' | Δ 200' | Δ 100' | Δ 50' | Δ 10' | Δ 5' | Δ 2' | Δ 1' | Δ 0,1' |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Anzahl der Versuche " n " | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| Arithm. Mittelwert " $\bar{x}$ " in µg NP | 1,5 | 2,5 | 3,2 | 3,8 | 3,3 | 4,1 | 3,5 | 3,3 | 2,8 |
| Standardabweichung | 0,48 | 1,5 | 1,0 | 0,87 | 1,1 | 1,2 | 0,73 | 1,5 | 1,3 |
| min. - max. in µg NP | 1,0-2,5 | 1,7-3,5 | 2,2-4,2 | 3,0-4,7 | 2,5-4,2 | 3,5-5,5 | 2,4-4,4 | 2,6-3,9 | 1,7-3,2 |

Tabelle 3 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter Etretinat ohne PHA - P

| µg Etretinat | 0 | Δ 200 | Δ 100 | Δ 50 | Δ 10 | Δ 5 | Δ 2 | Δ 1 | Δ 0,1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Anzahl der Versuche " n " | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| Arithm. Mittelwert " $\bar{x}$ " in µg NP | 0 | 0,54 | 0,72 | 0,66 | 1,61 | 0,79 | 0,83 | 0,65 | 0,5 |
| Standardabweichung | 0 | 0,28 | 0,31 | 0,23 | 0,50 | 0,42 | 0,31 | 0,28 | 0,28 |
| min. - max. in µg NP | 0 | 0,2-1,0 | 0,3-1,1 | 0,3-1,0 | 1,1-2,2 | 0,5-1,5 | 0,5-1,3 | 0,3-1,1 | 0,1-0,9 |

Tabelle 4 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter Etretinat mit 50 µg PHA - P

| µg Etretinat | Δ K' | Δ 200' | Δ 100' | Δ 50' | Δ 10' | Δ 5' | Δ 2' | Δ 1' | Δ 0,1' |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Anzahl der Versuche " n " | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| Arithm. Mittelwert " $\bar{x}$ " in µg NP | 1,5 | 2,2 | 2,3 | 2,5 | 3,4 | 2,6 | 2,1 | 2,0 | 1,8 |
| Standardabweichung | 0,48 | 1,0 | 0,98 | 1,12 | 1,10 | 1,3 | 1,2 | 1,2 | 1,2 |
| min. - max. in µg NP | 1,2-2,5 | 1,5-2,8 | 1,4-2,8 | 1,7-3,5 | 2,5-4,4 | 1,7-3,5 | 1,3-3,0 | 1,5-2,7 | 1,2-2,7 |

Tabelle 5 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter der freien Säure Ro 10 - 1670 o. PHA-P

| µg freie Säure | 0 | Δ 200 | Δ 100 | Δ 50 | Δ 10 | Δ 5 | Δ 2 | Δ 1 | Δ 0,1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Anzahl der Versuche " n " | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| Arithm. Mittelwert " $\bar{x}$ " in µg NP | 0 | 0 | 0 | 4,1 | 1,2 | 2,9 | 0,85 | 0,54 | 0,44 |
| Standardabweichung | 0 | 0 | 0 | 1,3 | 1,1 | 1,3 | 0,3 | 0,1 | 0,3 |
| min. - max. in µg NP | 0 | 0 | 0 | 2,7-5,0 | 0,4-2,5 | 1,7-4,0 | 0,4-1,6 | 0,2-1,1 | 0,2-1,0 |

Tabelle 6 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter der freien Säure Ro 10 - 1670 mit PHA-P

| µg freie Säure | Δ K' | Δ 200' | Δ 100' | Δ 50' | Δ 10' | Δ 5' | Δ 2' | Δ 1' | Δ 0,1' |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Anzahl der Versuche " n " | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 | 27 |
| Arithm. Mittelwert " $\bar{x}$ " in µg NP | 1,5 | 0 | 0 | 4,7 | 2,6 | 4,6 | 2,1 | 1,5 | 1,5 |
| Standardabweichung | 0,4 | 0 | 0 | 1,7 | 1,0 | 0,9 | 0,9 | 0,8 | 0,9 |
| min. - max. inµg NP | 1,0-2,5 | 0 | 0 | 3,5-5,7 | 1,7-3,6 | 3,5-5,4 | 1,2-3,0 | 0,8-2,5 | 0,7-2,4 |

Abbildung 1 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter Isotretinoin ohne PHA - P (einschließlich min. und max.)
Signifikanzen: im Text

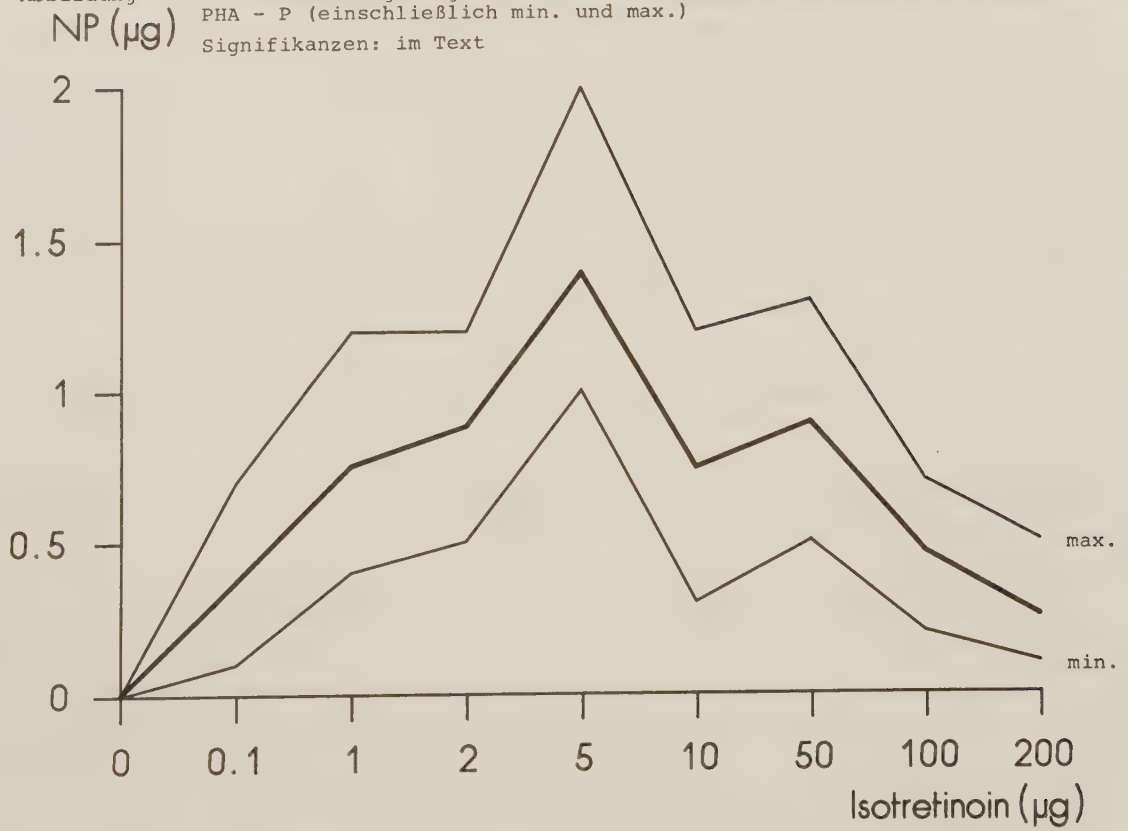


Abbildung 2 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter Isotretinoin mit PHA - P (einschließlich min. und max.)

Signifikanzen: im Text

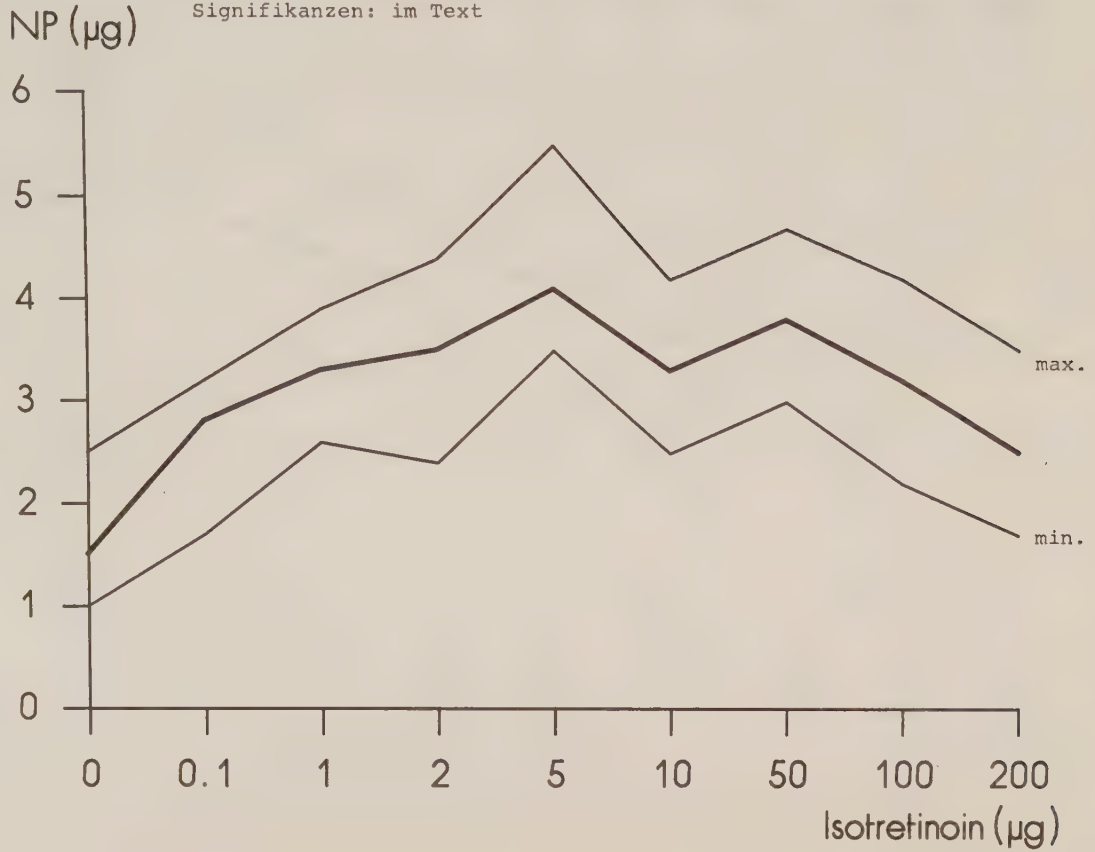


Abbildung 3 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter Etretinat ohne PHA - P (einschließlich min. und max.)
Signifikanzen: im Text

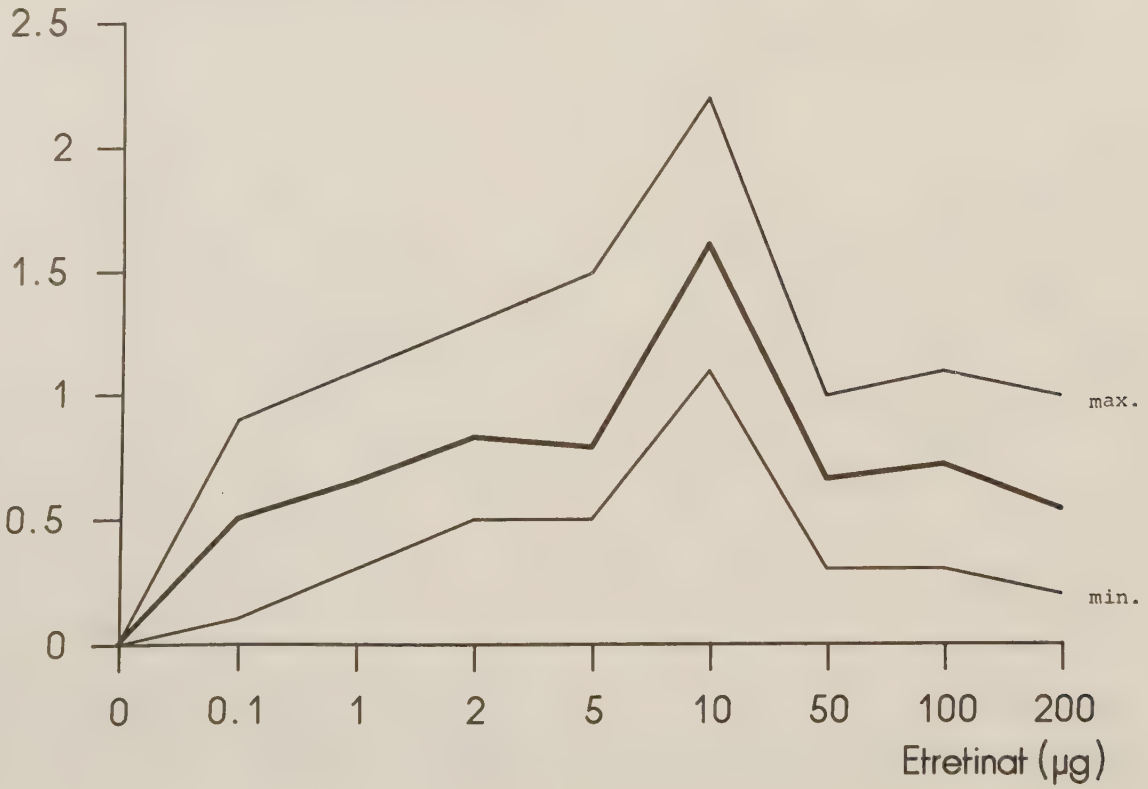


Abbildung 4 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter Etretinat mit PHA - P (einschließlich min. und max.)

Signifikanzen: im Text

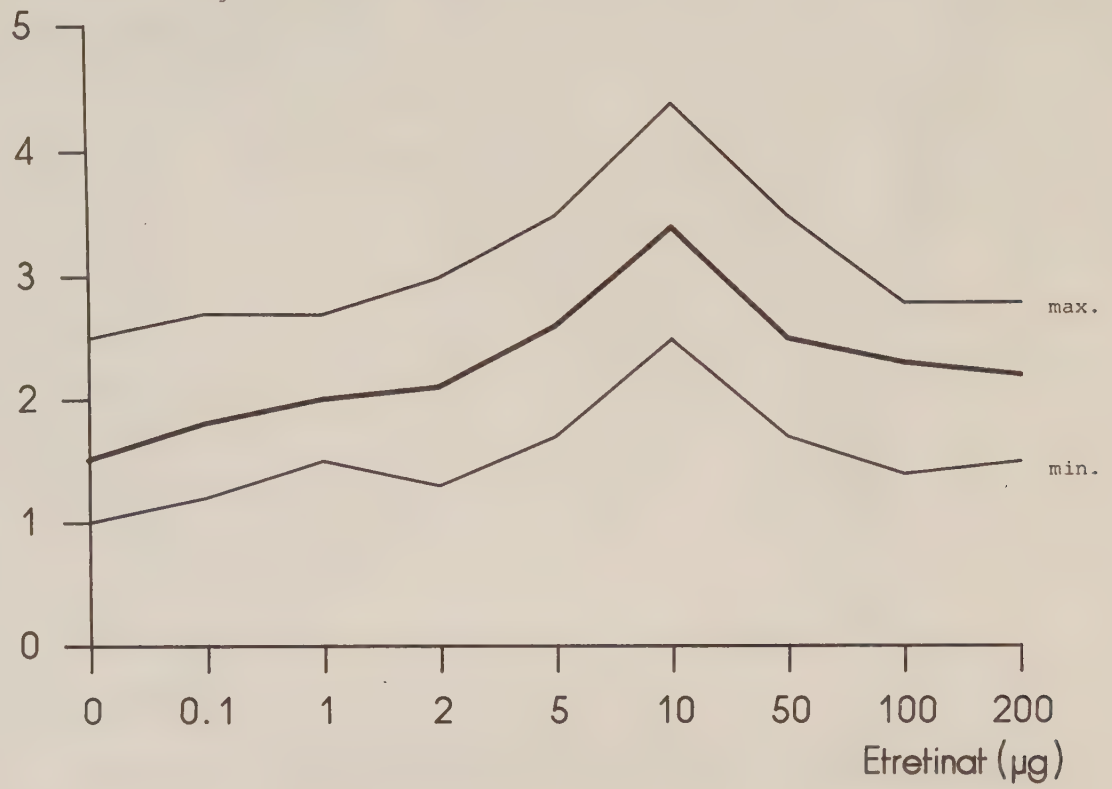


Abbildung 5 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter der freien Säure Ro 10 - 1670 ohne PHA - P (einschließlich min. und max.)

Signifikanzen: im Text

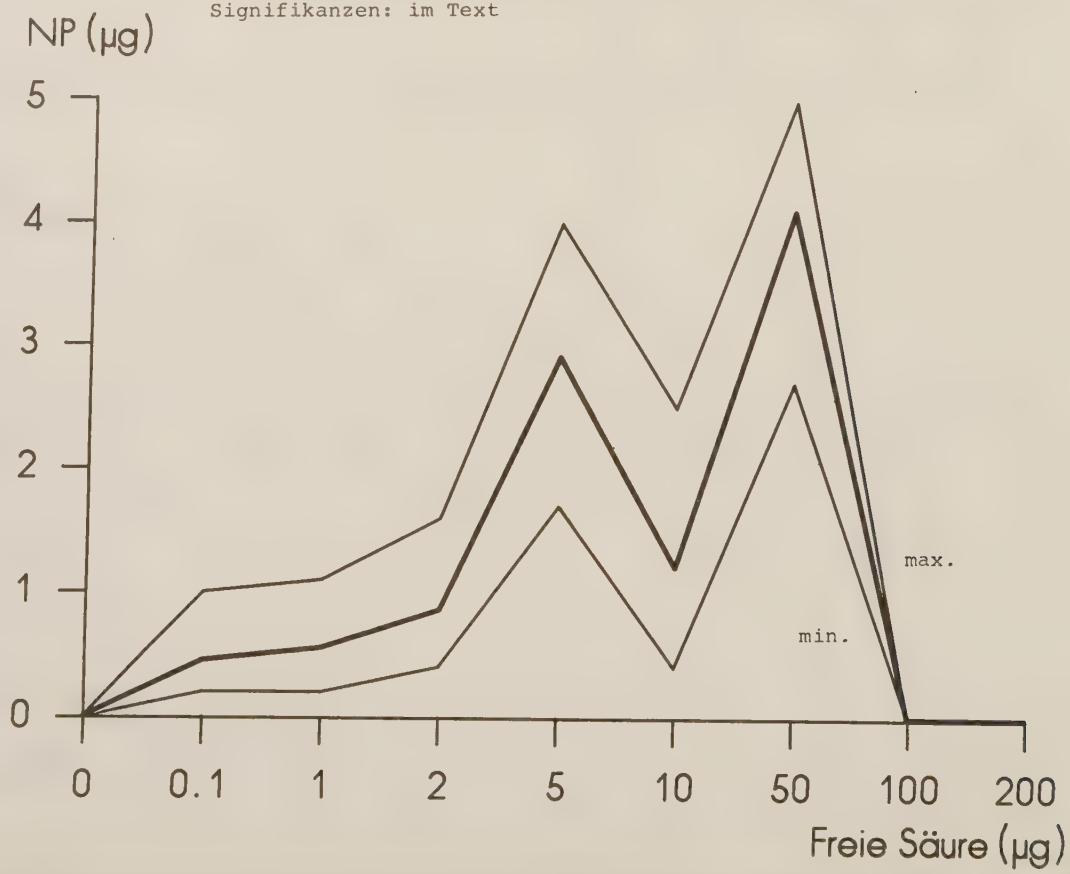


Abbildung 6 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter der freien Säure Ro 10 - 1670 mit PHA - P (einschließlich min. und max.)

Signifikanzen: im Text

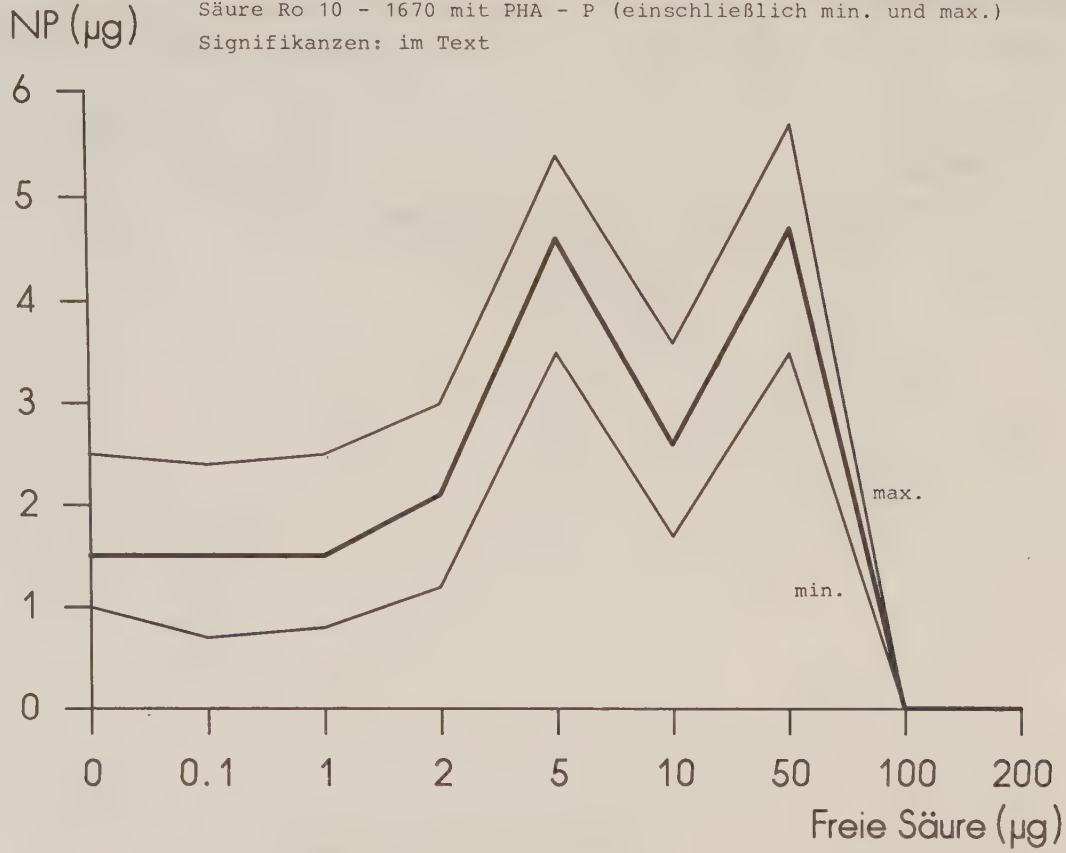


Abbildung 7 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter

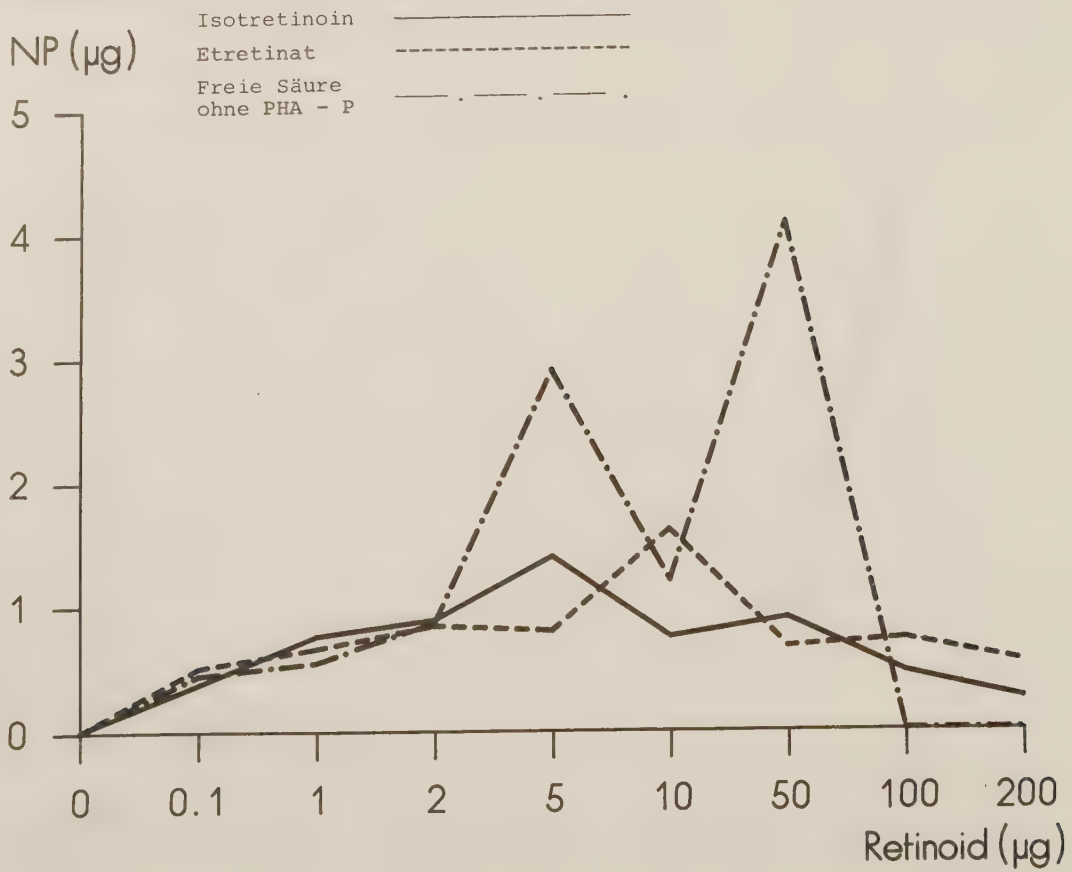


Abbildung 8 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP unter

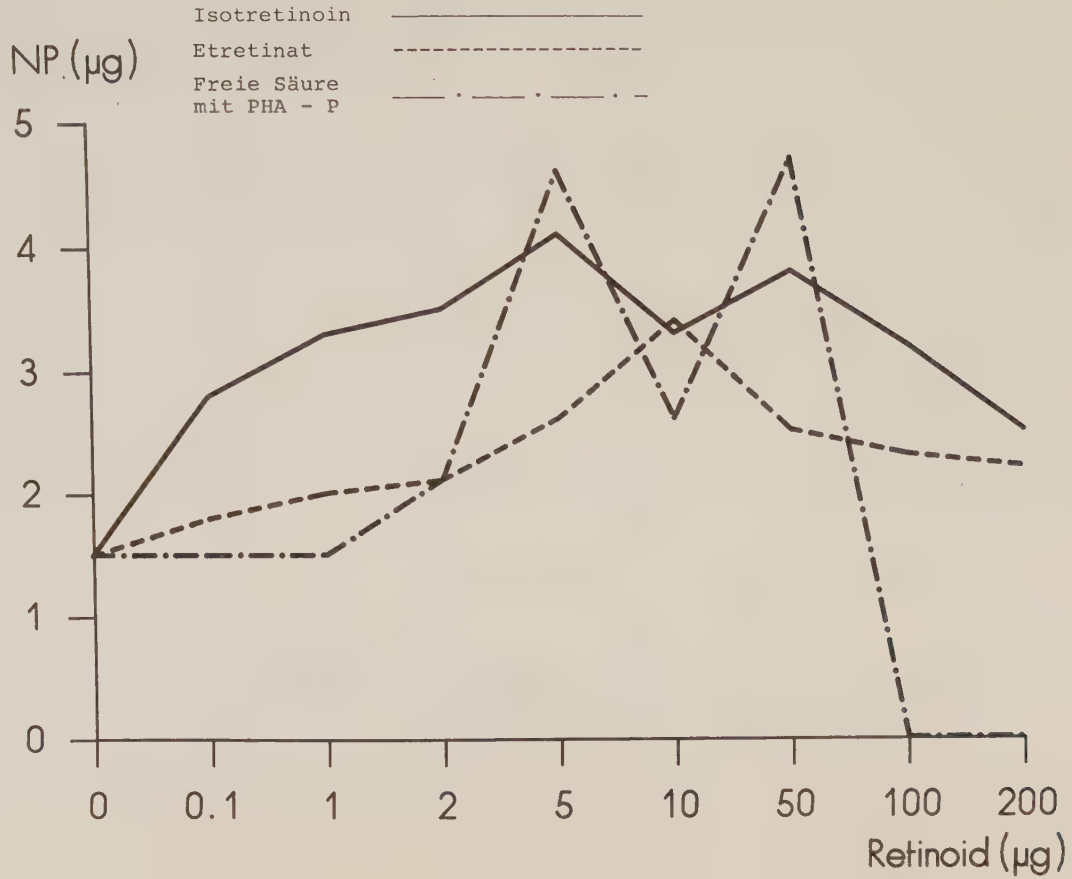


Tabelle 7 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP nach einer Dosis von 50 µg PHA - P

| Kollektiv | Therapiedauer in Tagen | Dosis in mg Retinoid/Tag (min.-max.) | Enzymaktivität (Mittelwert) | Standardabweichung | Streubreite | Signifikanz |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Klinisch gesunde Probanden ( n = 90 ) | - | - | 1,57 µg NP | 0,87 | 0,6 - 3,7 µg NP | |
| Patienten mit Psoriasis vulgaris ( n = 7 ) | - | - | 1,57 µg NP | 0,64 | 0,9 - 2,6 µg NP | |
| Patienten mit Psoriasis vulgaris (kurzfristige Therapie) ( n = 17 ) | 10 - 37 Tage | 25 - 40 mg Etretinat | 7,70 µg NP | 2,0 | 5,3 - 11,5 µg NP | $p \leq 0,01$ |
| Patienten mit M. Darier ( n = 3 ) | 12 - 20 Tage | 35 - 50 mg Etretinat | 10,0 µg NP | 0,7 | 9,2 - 10,7 µg NP | |
| Patienten mit Akne conglobata (kurzfristige Therapie) (n = 9 ) | 17 - 110 Tage | durchschnittl. 55 mg Isotretinoin | 6,3 µg NP | 1,9 | 3,0 - 8,3 µg NP | $p \leq 0,01$ |

Tabelle 8 : Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase in µg NP nach einer Dosis von 50 µg PHA - P bei Patienten (Psoriasis und Akne), die schon länger als 1 Jahr unter oraler Retinoidtherapie standen (Langzeiteffekt)

| Kollektiv | Therapiedauer | Dosis in mg Retinoid/Tag | Enzymaktivität (Mittelwert) | Standardabweichung | Streubreite | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Patienten mit Psoriasis vulgaris ( n = 3 ) | länger als 1 Jahr | 40 mg Etretinat / Tag | 1,25 µg NP | 0,36 | 0,8 - 1,6 µg NP | |
| Patienten mit Akne conclobata ( n = 3 ) | länger als 1 Jahr | 30 mg Isotretinoin / Tag | 1,6 µg NP | 0,4 | 1,2 - 2,0 µg NP | |

## VII. Diskussion der Ergebnisse

Natürliche und synthetische Retinoide können offenbar die Funktionen des Immunsystems beeinflussen. Dieser Effekt hängt sowohl von dem jeweiligen Retinoidderivat als auch von dem momentanen Zustand und der Herkunft der immunkompetenten Zellen ab (Sidell et al (24)). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern sich Isotretinoin, Etretinat und die freie Säure des aromatischen Retinoids in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1; 1; 2; 5; 10; 50; 100; 200 µg Retinoid) in vitro und unter therapeutischen Bedingungen immunmodulatorisch auswirken.

Als Modell wurde die Steigerung der cytoplasmatischen sauren Phosphataseaktivität peripherer Blutlymphocyten klinisch gesunder Probanden unter Retinoidinkubation mit und ohne PHA - P herangezogen. Unter therapeutischen Bedingungen wurde die Steigerung der Phosphataseaktivität humaner Lymphocyten nach PHA - P Exposition von klinisch gesunden Probanden mit der Steigerung der Phosphataseaktivität humaner Lymphocyten nach PHA - P Gabe bei mit Etretinat (Tigason®) und Isotretinoin (Roaccutan®) behandelten Patienten verglichen. Quantifiziert wurde die Phosphataseaktivität an Hand einer zeitlich limitierten Umsetzungsreaktion von Nitrophenylphosphat zu Nitrophenol. Die Aktivitätszunahme der cytoplasmatischen sauren Phosphatase ist Ausdruck einer Stoffwechseländerung in den lymphocytären Zellen. Als Maß in der Veränderung der Aktivität in der sauren Phosphatase diente die Differenz in der Extinktion zwischen PHA - stimulierten und nicht stimulierten Testansätzen resp. den Testansätzen mit und ohne Retinoid. Die Werte waren dann mit Hilfe einer Eichkurve als freigesetzte Menge p - Nitrophenol (NP) interpretierbar. Bei der Messung der Enzymaktivität handelt es sich vom chemischen Gesichtspunkt her um eine Zweipunktemethode: p - Nitrophenolphosphat (NPP) wird in Phosphat und

p - Nitrophenol gespalten. Dieser Prozeß ist proportional zur Enzymaktivität und erfaßt ausschließlich die cytoplasmatische saure Phosphatase. Sowohl Ausgangs- wie Endprodukt sind im sauren pH - Bereich ungefärbt. Durch Alkalizusatz wird einerseits die Reaktion durch Enzymdenaturierung gestoppt, andererseits das p - Nitrophenol in das gelbe Nitrophenol - Ion (Delokalisation der Elektronen über das gesamte Molekül) überführt und damit photometrisch faßbar mit einer Farbentwicklung bei pH 12. Dementsprechend ist die Einheit der Phosphataseaktivität: µg Nitrophenol (µg NP). Die Steigerung der Phosphataseaktivität selbst ergab sich rechnerisch aus der Aktivität der sauren Phosphatase unter Retinoidinkubation mit und ohne PHA - P abzüglich der Basisphosphataseaktivität K (bei 2 x $10^5$ Lymphocyten ohne Retinoidinkubation und ohne PHA - P). Schon nach einer Stunde kam es zu einer Retinoid - induzierten Änderung in der Aktivität der cytoplasmatischen sauren Phosphatase.

Unter dem Einfluß von Isotretinoin zeigten periphere humane Lymphocyten eine signifikante Steigerung der Aktivität der sauren Phosphatase in einem Bereich von 5 µg ($p \leq 0{,}01$) und 50 µg Retinoid ($p \leq 0{,}01$). Der gleiche Effekt wurde sichtbar, wenn die Lymphocyten noch zusätzlich mit einer Dosis von 50 µg PHA - P stimuliert wurden. Offenbar ist eine Retinoidkonzentration von 5 µg bis 50 µg Isotretinoin der aktive Bereich im Hinblick auf die cytoplasmatische Phosphataseaktivität.

Unter Etretinat kam es bei einer Konzentration von 10 µg Retinoid zu einem signifikanten Anstieg ($p \leq 0{,}01$) der cytoplasmatischen Phosphataseaktivität, sowohl mit als auch ohne PHA - P Stimulation.

Unter der freien Säure des aromatischen Retinoids bei einer Konzentration von 5 µg und 50 µg zeigte die Phospha-

taseaktivität eine signifikante ($p \leq 0,01$) Steigerung, und zwar unabhängig davon, ob die Lymphocyten zusätzlich mit PHA - P stimuliert wurden oder nicht. Bemerkenswert ist bei der freien Säure die ausgeprägte Steigerung der Phosphataseaktivität bei den oben genannten Konzentrationen.

Somit konnte gezeigt werden, daß die drei verwendeten Retinoide selbst und unter mitogener Stimulierung der Lymphocyten einen Einfluß auf die cytoplasmatische Phosphataseaktivität der Zellen haben und somit immunmodulatorische Wirkungen entfaltendürften. Bemerkenswert ist die Tatsache, daß die Aktivitätsänderung des Enzyms bei einer Konzentration von 5 µg und 50 µg Isotretinoin bzw. 10 µg Etretinat gleich hohe Werte erreicht wie 50 µg PHA - P bei $2 \times 10^5$ Lymphocyten. Hier liegt die Vermutung nahe, daß die Retinoide, ähnlich wie das pflanzliche Mitogen PHA - P, vornehmlich auf den Stoffwechsel der Lymphocyten wirken. Inkubiert man nun die Lymphocytensuspension mit PHA - P und Retinoid, so summiert sich dieser Effekt beider Substanzen auf den Stoffwechsel der Zelle, welches dann in einer erhöhten Aktivität der cytoplasmatischen sauren Phosphatase seinen Ausdruck findet.

Nach Takenaga et al (29) kommt es nach Inkubation von Lymphocyten mit all - trans - Vitamin A - Säure zu einem Anstieg der Aktivität der sauren Phosphatase, möglicherweise, weil Vitamin A und seine Analoge die Durchlässigkeit von lysosomalen Membranen in den Lymphocyten fördern (Rogers et al (23)). Nach Wang et al (33) soll es dabei im Extremfall zu einer Destabilisierung der Lysosomenmembran kommen. Eine starke lysosomale Aktivierung der Zellen würde dann zu vermehrten Zahlen morbider und prämorbider Zellen führen, die nicht mehr in die Mitose eintreten. Toxische Effekte können

demnach bei hohen Retinoidkonzentrationen nicht ausgeschlossen werden. Ausgehend von einem gewissen Wirkungssynergismus von PHA und Retinoiden wäre es denkbar, daß auf der Zelloberfläche Rezeptoren für Retinoide existieren, in analoger Weise, wie die Existenz von Rezeptoren für pflanzliche Mitogene und Antigene bekannt ist.

Bauer und Orfanos (7) untersuchten den Einfluß der freien Säure als Hauptmetaboliten des Etretinats auf periphere humane Lymphocyten in Gegenwart von Lectinen (ConA, PHA - M, PHA - P und PWM). Dabei unterdrückte dieses Retinoid die durch Mitogene induzierte DNS - Synthese bei peripheren humanen Blutlymphocyten in vitro, während es ohne zusätzliche Gabe von Mitogenen keinen Effekt zeigte. Nach den Autoren besteht ein möglicher Mechanismus für die Interaktion von Retinoid, Lymphocyten und Mitogen darin, daß das Retinoid sich auf der Zellmembran der Lymphocyten anhaftet und somit einen zellulären Angriff für das Mitogen unmöglich macht; andererseits wäre es auch möglich, daß das Retinoid sich an den hydrophoben Teil des Mitogenmoleküls anlagert, wodurch die mitogene Stimulierung ausbleibt. Dieselben Autoren zeigten, daß sich nach Bindung des Retinoids an das Mitogen das UV - Spektrum ändert.

In der vorliegenden Arbeit konnte demgegenüber gezeigt werden, daß zwischen PHA - P und den untersuchten Retinoiden einschließlich der freien Säure in bezug auf die Aktivität der cytoplasmatischen sauren Phosphatase ein Wirkungssynergismus besteht. Voßmann (32) stellte in seinen Untersuchungen eine signifikant negative Korrelation zwischen dem Aktivitätsniveau der sauren Lymphocytenphosphatase und der Blastogenese der Lymphocyten heraus. Eine erhöhte Aktivität der sauren Phosphatase würde dafür sprechen, daß Retinoide, zumindest in bestimmten Konzentrationen, die blastogene Aktivität der Lymphocyten

herabsetzen, während sie ihre metabolische Aktivität steigern. Ein längeres Ausharren in der Intermitose bedeutet eine Verschlechterung des spezifisch für die kontinuierliche Zellreproduktion notwendigen Metabolismus und "innerem Milieu"; das Intervall bis zur Rückkehr zur Proliferation nimmt zu. Retinoide könnten demnach über diesen Wirkungsmechanismus die Generationszeit der Zellen verlängern und damit zu einer veränderten Teilungsfraktion führen.

Die vorliegende Arbeit zeigt ferner, daß die Modulation der Immunantwort durch Isotretinoin, Etretinat und die freie Säure des aromatischen Retinoids dosisabhängig ist, wenn man als Modell die Aktivitätssteigerung der cytoplasmatsichen sauren Phosphatase heranzieht. Bauer und Orfanos (7) fanden in ihren Untersuchungen, bei denen sie als Modell den $^{3}H$ - Thymidin - Einbau in periphere humane Blutlymphocyten herangezogen haben, ebenfalls eine dosisabhängige Modulation der Immunantwort humaner Lymphocyten durch Ro 10 - 1670.

In einem zweiten Ansatz sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob die Ergebnisse, die man aus den Versuchen in vitro gewonnen hatte, auf die Verhältnisse unter therapeutischen Bedingungen in vivo übertragen werden können. Aus diesem Grunde wurde die Aktivitätssteigerung der cytoplasmatischen sauren Phosphatase nach 50 µg PHA - P bei einem Kollektiv von klinisch gesunden Probanden ermittelt. Anschließend wurde eine Gruppe von Patienten mit Psoriasis vulgaris zusammengestellt und auch hier die Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase nach PHA - P bestimmt. Damit sollte ausgeschlossen werden, daß allein der Zustand der Psoriasis vulgaris für die erhöhte Aktivität der sauren Phosphatase verantwortlich gemacht werden kann. Dabei zeigte sich, daß die Steigerung der Phosphataseaktivität beim Normal-

und im Psoriatiker - Kollektiv gar nicht oder nur gering voneinander abwich, woraus folgt, daß der Zustand der Psoriasis vulgaris allein keinen Einfluß auf die Phosphataseaktivität hat. Demgegenüber war die Enzymaktivität bei Patienten mit Psoriasis vulgaris, Morbus Darier und schwerer Akne vulgaris, die mit Etretinat bzw. Isotretinoin behandelt worden waren, verändert: die Steigerung der Phosphataseaktivität war bei diesen, mit Retinoid behandelten Patienten, nach PHA - P - Stimulierung der Lymphocyten signifikant ($p \leq 0{,}01$) höher als beim Normalkollektiv resp. den Patienten, die kein Retinoid erhalten hatten. Etretinat (Tigason®) und Isotretinoin (Roaccutan®) sind demnach in vitro und unter therapeutischen Bedingungen auf die Phosphataseaktivität peripherer humaner Blutlymphocyten wirksam, d.h. auch in vivo zeigen Retinoide eine Modulation der Immunantwort von Blutlymphocyten.

Weiterhin erschien uns die Frage interessant, ob die Steigerung der Phosphataseaktivität nach PHA - P bei Patienten unter oraler Retinoidtherapie dauerhaft ist. Aus diesem Grunde wurde ein gesondertes Kollektiv von Psoriatikern und Patienten mit schwerer Akne vulgaris, die schon länger als 1 Jahr mit oralen Retinoiden behandelt worden waren, untersucht und die Befunde gesondert ausgewertet. Überraschenderweise zeigte die Aktivitätssteigerung der sauren Phosphatase nach PHA - P nahezu gleiche Werte wie beim Normalkollektiv. Aus diesen Ergebnissen folgt, daß der Effekt der Retinoide auf die cytoplasmatische saure Lymphocytenphosphatase nicht von Dauer ist; zumindest nach 1jähriger Behandlungszeit ist der Retinoideffekt auf die Blutlymphocyten nicht mehr nachweisbar. Wahrscheinlich verfügen die Lymphocyten über die Fähigkeit, sich an den hohen Retinoidspiegel zu adaptieren und nach Langzeittherapie zu einem Normalzustand zurückzukehren.

## VIII. Zusammenfassung

Retinoide sind offenbar in der Lage, sowohl in vitro als auch in vivo Enzymfunktionen in peripheren Blutlymphocyten zu beeinflussen. Im hier ausgewählten Modell der cytoplasmatischen sauren Phosphataseaktivität fand sich eine dosisabhängige Modulation durch Isotretinoin, Etretinat und durch die freie Säure des aromatischen Retinoids in vitro und in vivo.

Bemerkenswert war eine ausgeprägte Steigerung der Phosphataseaktivität unter Isotretinoin in einer Konzentration von 5 µg bis 50 µg, unter Etretinat in einer Konzentration von 10 µg und unter der freien Säure in einer Konzentration von 5 µg und 50 µg in vitro. Der gleiche Effekt trat auf, wenn man die Lymphocyten zusätzlich mit einer Dosis von 50 µg PHA - P stimulierte.

Der Hauptangriffspunkt der Retinoide könnte entweder in einem Rezeptor auf der Zellmembran oder auch intrazellulär liegen. Die gesteigerte Aktivität der cytoplasmatischen sauren Phosphatase durch Retinoid steht somit in negativer Beziehung zur Blastogenese der Lymphocyten, die unter denselben Retinoiden als reduziert beschrieben wurde. Somit entspricht die Erhöhung der Phosphataseaktivität einer supprimierten Lymphocytenblastogenese.

Auch unter therapeutischen Bedingungen in vivo kam es bei Patienten, die unter Behandlung mit oralen Retinoiden standen, im Vergleich zu einem Normalkollektiv klinisch gesunder Probanden oder nicht behandelter Psoriatiker zu einer signifikanten Erhöhung der Aktivität der cytoplasmatischen sauren Phosphatase peripherer humaner Blutlymphocyten nach einer Dosis von 50 µg PHA - P. Dieser Effekt war jedoch nach einjähriger Retinoidtherapie nicht mehr nachweisbar. Wahrscheinlich besitzen die peripheren

Blutlymphocyten die Fähigkeit, sich an einen hohen Retinoidspiegel zu adaptieren und in bezug auf ihre cytoplasmatische Phosphataseaktivität zu einem Normalzustand zurückzukehren.

## IX. Literatur

1. Abb J, Abb H, Deinhardt F
Effect of retinoic acid on the spontaneous and interferon induced activity of human natural killer cells. Int. J. Cancer 30: 307 - 310 (1982)

2. Abb J, Deinhardt F
Effects of retinoic acid on the human lymphocyte response to mitogens. Exp. Cell Biol. 48: 169 - 179 (1980)

3. Athanassiades TH
Adjuvant effect of vitamin A palmitate and analoges on cell - mediated immunity. J. Nat. Cancer Inst. 67: 1153 - 1156 (1981)

4. Allison AC, Malluci L
Lysosomes in dividing cells with special reference to lymphocytes. Lancet 2: 1371 - 1375 (1964

5. Barnett JB
Immunopotentiation of the IgE antibody response by 13 - cis - retinoic acid. Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 67: 287 - 290 (1982)

6. Bauer R, Orfanos CE
Influence of retinoid on human blood cells in vitro. TMMP - retinoid inhibits the mitogenic properties of lectins and modulates the lymphocytic response. In: Retinoids. Advances in Basic Research and Therapy. Ed. by C.E. Orfanos and O. Braun - Falco, E.M. Farber, Ch. Grupper, M.K. Polano, R. Schuppli. Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1981), pp 153 - 160

7. Bauer R, Orfanos CE
Trimethylmethoxyphenol - retinoic acid (Ro 10 - 1670) inhibits mitogen - induced DNA - synthesis in peripheral blood lymphocytes in vitro. Br. J. of Derm. 105: 19 - 24 (1981)

8. Bauer R, Schütz R, Orfanos CE
Impaired motility and random migration of vital polymorphonucleares in vitro after therapy with oral aromatic retinoid in psoriasis. Int. J. Dermatol. 23: 72 - 77 (1984)

9. Bialasiewicz AA, Lubach D, Marghescu
Immunological features of psoriasis: effects of Ro 10 - 9359, concanavalin A (ConA), pokeweed mitogen (PWM) and methotrexate (MTX) on cultivated lymphocytes. In: Retinoids. Advances in Basic Research and Theapy. Ed. by C.E. Orfanos and O. Braun - Falco, E.M. Farber, Ch. Grupper, M.K. Polano, R. Schuppli. Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1981), pp 335 - 338

10. Dennert G, Crowly C, Kouba J, Lotan R
Retinoic acid stimulation of the induction af mouse killer T - cells in allogenic and syngenic systems. J. Nat. Cancer Inst. 62: 89 - 94 (1979)

11. Diener E, Langmann RE
Antigen recognition in induction of immunity. Prog. Allergy 18: 6 - 10 (1975)

12. Fulton RA, Souteyrand P, Thivolet J
Influence of retinoid Ro 10 - 9359 on the cell - mediated immunity in vivo. Dermatologica 165: 568 - 572 (1982)

12a. Gillissen G, Spölgen W, Sticker A
Variation of lymphocyte classes and their PHA - reactivity with age. Z. Immun. Forsch. 153: 107 - 119 (1977)

12b. Gillissen G, Mecke E
Increased lysosomal acid phosphatase activity as an early event of phytohaemagglutinin stimulation. Z. Immun. Forsch. 146: 55 - 70 (1973)

13. Greaves M, Janossy G
Elicitation of selective T - and B - lymphocyte response by cell surface binding ligands. Transplant. Rev. 11; 87 - 95 (1972)

14. Hercend TH, Bruley - Rosset M, Florentin I, Mathé G
In vivo immunostimulating properties of two retinoids: Ro 10 - 9359 and Ro 13 - 6298. In: Retinoids. Ed. by C.E. Orfanos and O. Braun - Falco, E.M. Farber, Ch. Grupper, M.K. Polano, R. Schuppli. Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1981), pp 21 - 30

15. Handmarker SD, Cooper HL
The kinetics of PHA - stimulation of human lymphocytes. In: Proceeding of the third annual leucocyte culture conference. Ed. by W.O. Rieke. Appleton Century - Crofts, Division of Meredith Corporation, New York (1969), pp 53 - 68

16 Hirschborn K, Hirschborn R
Role of lysosomes in the lymphocytic response. Lancet 1: 1046 - 1050 (1965)

17. Hirschborn R, Kaplan, JM, Goldberg AF, Hirschborn K, Weissmann G
Acid - phosphatase - rich granules in human lymphocytes induced by PHA. Science 147: 55 - 60 (1965)

18. Hof H, Emmerling P
Stimulation of cell mediated resistance in mice to infection with Listeria monocytogenes by vitamin A. Ann. Immunol. 130; 587 - 594 (1979)

19. Hof H, Wirsing CH
Anti - infective properties of vitamin A. Ernährungswissenschaften 18: 221 - 232 (1979)

20. Mastro AM, Pepin KG
The effects of retinoic acid and a tumor promotor, 12 - 0 - tetradecanoylphorbol - 13 - acetate, on lymphocyte proliferation. Carcinogenesis 3: 409 - 413 (1982)

21. Micksche M, Cerni C, Kokron O, Titscher R, Wrba H
Stimulation of immune response in lung cancer patients by vitamin A therapy. Oncology 34: 234 - 238 (1977)

22. Rhodes J, Oliver S
Retinoids as regulators of macrophage function. Immunology 40: 467 - 471 (1980)

23. Rogers MA, Marigold JC, Hume SP
The effect of retinol on the hypertheral response of normal tissue in vivo. Radiat. Res. 95: 165 - 174 (1983)

24. Sidell N, Famatiga E, Golub SH
Augmentation of human thymocyte proliferative responses by retinoic acid. Exp. Cell Biol. 49: 239 - 245 (1981)

25. Skinnider LF, Giesbrecht K
Inhibition of phorbol myristate acetate and PHA - stimulation of human lymphocytes by retinol. Cancer Res. 39: 3332 - 3334 (1979)

26. Soppi AM, Soppi E, Jansén CT
Effect of systemic Ro 10 - 9359 treatment on immunological parameters in Darier's disease. In: Retinoids. Advances in Basic Research and Therapy. Ed. by C.E. Orfanos and O. Braun - Falco, E.M. Farber, Ch. Grupper, M.K. Polano, R. Schuppli. Springer - Verlag Berlin, Heidelberg, New York (1981), pp 321 - 324

27. Soppi E, Tertti R, Soppi AM et al
Differential in vivo effects of etretinate and retinoic acid on the PHA and ConA induced lymphocyte transformation, suppressor cell induction and leucocyte migration inhibitory factor (LMIF) production. Int. J. Immunopharm. 4: 437 - 443 (1982)

28. Spölgen WJ
Reaktivität von Lymphocyten auf PHA und Quantifizierung von Lymphocytenklassen im peripheren Blut bei malignen Tumoren. Dissertation, Aachen (1979)

29. Takenaga K, Hozumi M, Sakagami Y
Effects of retinoids on induction of differentiation of cultured mouse myeloid leucemia cells. Cancer Res. 40: 914 - 919 (1980)

30. Tsambaos D, Orfanos CE
Ultrastructural evidence suggesting an immunomodulatory activity of oral retinoid. Its effect on dermal components in psoriasis. Br. J. of Dermatol. 104: 37 - 45 (1981)

31. Uhlenbruck G
Immunbiologie. Eine Einführung, Goldmann Verlag München

32. Voßmann D
Mitogene Stimulierbarkeit peripherer Lymphocyten. Dissertation, Aachen (1982)

33. Wang CC, Straight S, Hill DL
Destabilisation of mouse liver lysosomes by vitamin A compounds and analoges. Biochem. Pharmacol. 25: 471 - 475 (1976)

34. Yam LT, Mitus WJ
The lymphocyte ß - glucuronidase activity in lymphoproliferative disorders. Blood 31: 480 - 484 (1968)

## Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Universitäts - Hautklinik und Poliklinik im Klinikum Steglitz der Freien Universität angefertigt. Dem Direktor der Klinik, Herrn Prof. Dr. C.E. Orfanos, möchte ich für die Vergabe des Themas, für die Durchsicht und die Korrektur dieser Arbeit sowie für seine Unterstützung und Ratschläge herzlich danken.

Weiterhin gilt mein Dank folgenden Personen, die mich bei der technischen Durchführung der Arbeit in jeder Hinsicht unterstützt haben:
Herrn Prof. Dr. R. Bauer danke ich für die Beschaffung von wichtigen Literaturstellen und
Herrn Prof. Dr. Fuchs bin ich für die statistische Beratung und die Anleitung am Computer sehr verbunden.
Herr Dr. Voßmann gab mir wertvolle Ratschläge bei der Durchführung der Experimente und
Frau Gerline Apitsch half mir bei der Beschaffung der Materialien.
Frau Meyer hat diese Arbeit getippt. Auch ihr möchte ich herzlich danken.

## Lebenslauf

Ich, Hartmut Tiel, wurde am: 26. Juli 1958 in Duisburg als drittes Kind des Beamten Erich Tiel und seiner Ehefrau Maria geboren. Von 1964 bis 1967 besuchte ich die Grundschule in Kapellen, Kreis Moers. Von 1968 bis 1977 besuchte ich das private Julius - Stursberg - Gymnasium der evangelischen Kirche im Rheinland in Neukirchen Vluyn.

| | |
|---|---|
| Sommer 1977: | Abitur |
| Herbst 1977: | Immatrikulation an der Freien Universität Berlin |
| Frühjahr 1980: | Ärztliche Vorprüfung |
| Frühjahr 1981: | I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| Frühjahr 1983: | II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| Frühjahr 1984: | III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 22. Juni 1984: | Approbation |

Seit 15. November 1984 bin ich wissenschaftlicher Assistent an der Hautklinik im Klinikum Steglitz der Freien Universität Berlin